

Anti GAD

pour analyses de routine

Test ELISA quantitatif pour la détermination des auto-anticorps circulants contre les antigènes GAD

IVD  LOT Voir l'étiquette externe  2°C 8°C Σ= 96 tests RÉF DKO082

USAGE PRÉVU

Le coffret ELISA Anti-GAD est un test pour la détermination quantitative in vitro des auto-anticorps circulants contre les antigènes GAD (acide glutamique décarboxylase) chez les sujets prédiabétiques à haut risque et chez les patients diabétiques IDDM.
Le kit Anti GAD est destiné exclusivement à un usage en laboratoire.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

Le diabète de type 1, aussi connu comme mellitus insulinodépendant (IDDM), est caractérisé par la destruction auto-immunitaire chronique des cellules bêta qui sécrètent l'insuline. Cette pathogenèse est probablement due à l'exposition de sujets génétiquement susceptibles à des agents environnementaux. On pense que la destruction auto-immunitaire des cellules bêta pancréatiques est complètement asymptomatique jusqu'à la perte de 80-90% des cellules. Ce processus peut commencer à tout âge et peut durer des années avant d'être complètement achevé. Durant la phase préclinique, ce processus auto-immunitaire peut être mis en évidence par la présence d'auto-anticorps circulants contre les antigènes des cellules pancréatiques bêta. Ces auto-anticorps tels que l'anti- acide glutamique décarboxylase (GAD), l'anti-insuline (IAA), et l'anti-tyrosine phosphatase ICA 512 (IA2) apparaissent des années avant le développement du diabète de type 1 et avant l'apparition des symptômes cliniques. La GAD, l'enzyme qui catalyse la conversion du glutamate en GABA, a été identifiée sous deux isoformes, avec des poids moléculaire de 65.000 (GAD65) et de 67.000 (GAD67). Bien que les anticorps GAD se trouvent tant dans le diabète de type 1 que dans le désordre neurologique rare appelé syndrome de Stiff-man (SMS), le profil des auto-anticorps GAD diffère dans les deux maladies. Les auto-anticorps des patients SMS reconnaissent une combinaison des épitopes GAD linéaire et de conformation tandis que les auto-anticorps GAD65 chez les patients avec diabète de type 1 sont principalement dirigés contre les épitopes de conformation. Les auto-anticorps GAD 65 (GAD 65 Ac) se trouvent chez 70-80% des patients avec diagnostic récent de diabète de type 1. La combinaison des auto-anticorps contre GAD65 et IA2 est très importante pour l'évaluation du risque de diabète de type 1 chez les enfants et les adolescents. La combinaison de ces tests est plus sensible et prédictive que les ICA dans les groupes à risque, comme par exemple les parents des patients avec diabète de type 1.
Les auto-anticorps GAD65 sont aussi présents dans les sous-groupes d'adultes avec un diabète de type 2. Ces patients peuvent avoir des hyperglycémies, et après une thérapie avec des agents hypoglycémiants qui varie de quelques mois à des années, ils peuvent devenir insulinodépendants. On pense que ces patients ont une forme lente et progressive de diabète de type 1, souvent appelée diabète latent ou diabète auto-immunitaire latent des adultes (LADA). La présence des auto-anticorps GAD65 dans le sérum de ces patients est un marqueur sensible et spécifique pour la
future dépendance à l'insuline.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le test utilise la capacité des auto-anticorps GAD65 à agir de façon bivalente et à former un pont entre la GAD immobilisée sur la plaque et la biotine-GAD65 en phase liquide. Dans la première phase, les auto-anticorps des échantillons se fixent à la GAD65 immobilisée dans les micropuits. Dans la deuxième phase, la Biotine-GAD65 se fixe à son tour à ce complexe. La Biotine-GAD65 fixée est proportionnelle à la quantité d'auto-anticorps GAD65 dans le sérum du patient. La biotine-GAD65 non fixée est éliminée par lavage. La biotine-GAD65 fixée peut être quantifiée par ajout de Streptavidine-peroxydase et d'un substrat chromogénique (TMB) avec lecture successive de la densité optique (DO) à 450 nm.

3. REACTIFS, MATERIAUX ET INSTRUMENTS

3.1. Réactifs et matériaux fournis dans le coffret

1. Étalons Anti-GAD (5 flacons, 0,7 mL chaque)
   STD1 RÉF **DCE002/8207-0**
   STD2 RÉF **DCE002/8208-0**
   STD3 RÉF **DCE002/8209-0**
   STD4 RÉF **DCE002/8210-0**
   STD5 RÉF **DCE002/8211-0**
2. Contrôles (2 flacons, 0,7 mL chaque, prêt à l'emploi)
   Contrôle négatif RÉF **DCE045/8201-0**
   Contrôle positif RÉF **DCE045/8202-0**
3. Streptavidine peroxydase conc. 20X (1 flacon, 0,7 mL)
   RÉF **DCE041/8241-0**
4. Diluant de Streptavidine peroxydase (1 flacon, 15 mL)
   RÉF **DCE048/8248-0**
5. Biotine GAD65 (3 flacons, lyophilisé)
   RÉF **DCE019/8219-0**
6. Diluant de Biotine GAD65 (2 flacons, 15 mL chaque)
   RÉF **DCE047/8247-0**
7. Microplaque coatée
   (1 microplaque sécable avec GAD65 purifiée absorbés) RÉF **DCE002/8203-0**
8. Substrat TMB (1 flacon, 15 mL)
   RÉF **DCE004/8204-0**
9. Solution d'arrêt (1 flacon, 12 mL)
   Acide sulfurique 0,25M RÉF **DCE005/8205-0**
10. Solution de lavage conc. 10X (1 flacon, 125 mL)
    RÉF **DCE006/8206-0**

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le coffret

Eau distillée.

3.3. Matériaux et instruments auxiliaires

Distributeurs automatiques.
Lecteur pour microplaques (450 nm).

4. AVERTISSEMENTS

- Ce coffret est exclusivement pour usage in vitro et l'essai doit être exécuté par un personnel expert.
- Utilisez les dispositifs de protection individuelle prévus pendant toute opération avec les réactifs fournis.
- Tous les réactifs d'origine humaine utilisés dans la préparation des étalons et des contrôles ont été testés et ont donné un résultat négatif pour la présence des anticorps anti-VIH, de l'antigène Hbs et des anticorps anti-VHC. Cependant, aucun test n'offre la certitude complète de l'absence du VIH, du VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, les Étalons et les Contrôles doivent être gérés comme matériaux potentiellement infectieux.
- Matériaux d'origine animale utilisées pour la préparation de cette trousse ont été obtenus à partir d'animaux sains et protéines bovines ont été obtenus à partir de pays non touchés par l'ESB, mais ces matériaux devraient être utilisées comme potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités d'azide de sodium (NaN_3) ou Proclin 300^R comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- L'azide de sodium peut être toxique s'il est ingéré ou absorbé à travers la peau ou les yeux ; de plus, il peut réagir avec les tubes de plomb ou de cuivre en formant des azotures métalliques potentiellement explosifs. Faire couler de grandes quantités d'eau si un évier est utilisé pour éliminer les réactifs et prévenir la formation d'azotures.
- Le Chromogène TMB contient un irritant qui peut être nocif si inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Pour empêcher des lésions, éviter toute inhalation ou ingestion par la peau ou les yeux et tout contact cutané ou oculaire.
- La solution d'arrêt est constituée d'une solution d'acide sulfurique dilué. L'acide sulfurique est poison et corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Pour prévenir toute brûlure chimique possible, éviter le contact avec la peau et les yeux.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H_2O_2 à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.

5. PRÉCAUTIONS D'USAGE

- Observer rigoureusement l'ordre des passages indiqué dans le présent protocole.
- Tous les réactifs doivent être conservés à une température contrôlée de 2-8°C dans leurs conteneurs originaux. Les exceptions sont clairement marqués.
- Avant usage, laisser reposer tous les éléments des coffrets et les échantillons à température ambiante (22-28°C) et mélanger avec soin.
- Ne pas échanger des éléments du coffret provenant de lots différents. Les dates d'échéance rapportées sur les étiquettes des récipients d'expédition et sur celles de tous les ampoules doivent être observées. Ne pas utiliser d'éléments au-delà de leur date d'échéance.
- **ATTENTION : le réactif conjugué a été conçu pour garantir la plus grande sensibilité de dosage et, à moins d'être utilisé à bon escient, il risque d'être contaminé par des agents extérieurs** : il est donc recommandé d'utiliser des consommables (embouts, flacons, cuvettes, etc.) à usage unique. Pour les dosages fractionnés, prélever la quantité exacte de conjugué nécessaire et éviter de réintroduire les résidus dans le flacon d'origine. De plus, en ce qui concerne les **dosages effectués avec des instruments automatiques et semi-automatiques**, il est conseillé, avant d'utiliser le conjugué, d'effectuer le nettoyage de la partie fluidique en s'assurant que les procédures de lavage, de déprotéinisation et de décontamination sont suffisamment efficaces pour éviter la contamination du conjugué : cette procédure est vivement recommandée lorsque le kit est traité dans des analyseurs qui ne contiennent pas d'embouts à usage unique.
  Dans ce but, Diametra met séparément à disposition un réactif de décontamination pour le lavage des aiguilles.
- Si vous utilisez des équipements automatisés est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le kit a été correctement validées.
- Un lavage incomplet ou peu soigné et une aspiration insuffisante du liquide dans les puits des tests ELISA peuvent provoquer un manque de précision et/ou un arrière-plan élevé.
- Il est important de maintenir constants les temps de réaction dans chaque puits afin d'obtenir les résultats susceptibles d'être répétés. Le pipetage des échantillons ne doit pas durer plus de 10 minutes afin d'éviter tout résultat incorrect. S'il se prolonge au-delà des 10 minutes, il est recommandé de suivre l'ordre de distribution. Si vous devez utiliser plus d'une microplaque, il est conseillé de répéter la courbe dose-réponse.
- L'ajout de la solution de substrat donne lieu à une réaction cinétique qui est interrompue par l'ajout de la solution de blocage. Par conséquent, il est nécessaire d'ajouter le substrat et la solution bloquante dans la séquence même afin d'éliminer toute variation temporelle pendant la réaction.
- Observer les instructions relatives à l'exécution du contrôle de qualité dans les laboratoires cliniques en testant les contrôles et/ou les groupes de sérum.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Ne pas utiliser des échantillons microbiologiquement contaminés ou des échantillons hautement lipémiques ou hémolysés.
- Les lecteurs de microplaques mesurent dans le sens vertical. Ne pas toucher le fond des puits.

6. PROCÉDURE

6.1. Préparation de la Biotine

Préparer une quantité suffisante de solution biotine GAD65 en reconstituant un flacon de biotine lyophilisée avec 5,5 mL de diluant pour la biotine GAD65 juste avant l'usage. Cette solution peut être conservée à 2-8°C pendant 3 jours.

6.2. Préparation de la solution de lavage

Préparer une quantité suffisante de solution de lavage en diluant la solution de lavage concentrée 1+9 avec de l'eau distillée ou désionisée. Par exemple, diluer 50 mL de la solution concentrée avec 450 mL d'eau distillée. La solution ne doit pas présenter de cristaux avant la dilution; dissoudre éventuellement les cristaux en chauffant au max à 37°C. La solution diluée peut être conservée à 2-8°C jusqu'à 30 jours.

6.3. Préparation de la streptavidine peroxydase

Préparer une quantité suffisante de solution de Streptavidine-peroxydase en diluant le concentré (20X) de streptavidine-perox 1+19 (ex: 0,25 mL strept concentrée avec 4,75 mL diluant pour strept-perox). La solution préparée est stable jusqu'à 16 semaines à 2-8°C.

6.4. Procédure

Le kit contient une microplaque avec 8x12 puits recouverts d'antigène GAD purifié. Le nombre de barrettes utilisées dans chaque essai dépend du nombre d'échantillons à analyser. Si on utilise toutes les 12 barrettes, ce test permet d'analyser un total de 40 échantillons de sérum dupliqué.

NOTE IMPORTANTE: Porter tous les réactifs, y compris les sérums, à température ambiante (22-28°C) avant l'analyse.

Réactif	Étalon	Échantillon /Contrôle	Blanc
Échantillon		**25 µL**	
Étalon S_1 –S_5	**25 µL**		
Contrôle		**25 µL**	
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incuber pendant 1 heure à température ambiante (22-28°C) en agitant à > 500 tpm. Retirer le contenu de chaque puits, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Biotine GAD65	**100 µL**	**100 µL**	
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incuber pendant 1 heure à température ambiante (22-28°C) en agitant à > 500 tpm. Retirer le contenu de chaque puits, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Streptavidine peroxydase	**100 µL**	**100 µL**	
Sceller la microplaque avec la pellicule de plastique et incuber pendant 20 minutes à température ambiante (22-28°C) en agitant > 500tpm. Retirer le contenu de chaque puits, laver les puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée.			
Substrat TMB	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Recouvrir la plaque et la laisser incuber 20 minutes dans l'obscurité à température ambiante (22-28°C).			
Solution d'arrêt	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Agiter doucement la microplaque. Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le Blanc dans les 5 min après l'ajout de la solution d'arrêt.			

7. RÉSULTATS

7.1. Courbe standard

La courbe standard est établie en traçant les valeurs moyennes des DO des standard 1-5 sur l'axe des ordonnées (axe y) contre les concentrations respectives des Ac GAD65 sur l'axe des abscisses (axe x). Il est de plus recommandé d'utiliser le contrôle négatif (voir ci-dessous).

La concentration des anticorps GAD65, des contrôles et des échantillons inconnus est lue directement en IU/ml en reportant la valeur de la DO à 450 nm sur la courbe standard.

Le kit anti-GAD peut aussi être utilisé avec Computer Assisted Analysis en utilisant un logiciel capable de tracer des courbes avec spline smoothing fit.

Exemple:

Échantillon	DO (a) 450 nm	DO (b) 450 nm	DO (moyenne)	IU/mL
Contrôle CI	0.145	0.121	0.133	1
Standard 1	0.244	0.283	0.264	5
Standard 2	0.351	0.391	0.371	18
Standard 3	0.684	0.740	0.712	35
Standard 4	1.765	1.868	1.817	120
Standard 5	3.397	3.702	3.550	250
Contrôle CII	---	---	---	---
Patient 1	0.850	0.857	0.854	41.8

7.2. Valeurs de Référence

anti-GAD	
Négatif	< 5.0 IU/mlL
Positif	≥ 5.0 IU/mL

8. CARACTERISTIQUES DE LA PROCEDURE

8.1. Calibration

Le kit anti-GAD est calibré par rapport aux préparations de référence WHO NIBSC 97/550, les concentrations d'anticorps GAD65 sont donc exprimées en IU/mL.

8.2. Linéarité

En considérant la nature hétérogène de la population des anticorps, leur spécificité et affinité, les valeurs théoriques attendues pour les dilutions des anticorps GAD65, pourraient dans certains cas ne pas correspondre à la concentration mesurée au cours d'un test de récupération.

8.3. Spécificité et Sensibilité

En utilisant un cut-off de 5 IU/ml, le kit anti-GAD a une sensibilité de 88,6% et une spécificité de 92,3%, chez les patients avec développement récent de diabète de type 1.

8.4. Limites de détection

La sensibilité analytique est établie à 0,24 IU/mL.

8.5. Précision

8.5.1. Intra-essai

La variabilité à l'intérieur du même coffret a été déterminée en répliquant (12x) la mesure de quatre sérums différents de contrôle. La variabilité intra-essai est ≤ 7,6%.

8.5.2. Inter-essai

La variabilité entre dosages différents a été déterminée en répliquant la mesure d'un sérum de contrôle avec

des coffrets appartenant à des lots différents. La variabilité inter-essai est ≤ 8,2%.

9. DISPOSITIONS RELATIVES À L'ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Les réactifs doivent être jetés conformément aux lois en vigueur.

BIBLIOGRAPHIE

- Batstra M, Anstoot H, Herbrink P: Prediction and diagnosis of type 1 diabetes using ß-cell autoantibodies. Clin Lab 2001; 47:497-507
- Seissler J,.Hatziagelaki E, Scherbaum WA: Modern concepts for the prediction of type 1 diabetes. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2001; 109 Suppl 2: S304-S316
- Pozzilli P, Manfrini S, Monetini L: Biochemical markers of type 1 diabetes; clinival use. Scand J Clin Lab Invest 2001;61:38-44
- Schernthaner G, Hink S, Kopp HP et al.: Progress in the characterization of slowly progressive autoimmune diabetes in adult patients (LADA or type1,5 diabetes). Exp Clin Endocrinol diabetes 2001; Suppl 2: S94-S108
- Winter WE, Harris N; Schatz D: Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. Clinical Diabetes 2002; 20: 183-191

Ed. 02/2011 **DCM82-3**

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI) Italie
Tél. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039–02–2133354.
Fabricant: Via E. Giustozzi 35/35a –
Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italie
Tél. 0039-0742–24851
Fax 0039–0742–316197
Courriel: info@diametra.com

IT *Spiegazione dei simboli* GB *Explanation of symbols* FR *Explication des symboles* ES *Significado de los simbolos*
DE *Verwendete Symbole* PT *Explicaçao dos simbolos*

IVD	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif médical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
RÉF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Nûmero de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo	yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d 'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l 'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numéro de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
Σ Σ = xx	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	Cont.	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitaciôn de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação			

SUGGESTIONS POUR LA RÉSOLUTION DES PROBLÈMES / DÉPANNAGE

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS
Aucune réaction colorimétrique de l'essai
- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)
- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)
- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage
- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé
- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé
- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs